

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

**Irf7 ja Ifn β funktsioon tüümuse tümotsüütide arengu eest
vastutavates tüümuse epiteelirakkudes ja dendriitrakkudes**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Artur Stoljar

Juhendajad

PhD Uku Haljasorg

PhD Tõnis Org

TARTU 2018

INFOLEHT

Irf7 ja Ifn β funktsioon tüümuse tümotsüütide arengu eest vastutavates tüümuse epiteelirakkudes ja dendriitrakkudes

Tüümus on üks immuunsüsteemi keskseid organeid, kus leiab aset tüümuse epiteelirakkude (*thymic epithelial cell*, TEC) ja dendriitrakkude (*dendritic cell*, DC) poolt juhitud ebaküpsete T-rakkude ehk tümotsüütide küpsemine. T-rakud on kriitilise tähtsusega immuunrakud, mis kaitsevad organismi patogeenide ja kasvajarakkude eest.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärk oli uurida Irf7 KO (*knock-out*) hiiri, et selgitada välja Irf7 (*interferon regulatory factor 7*) ja tema sihtmärkgeeni Ifn β (*interferon β*) funktsioon tümotsüütide arengu eest vastutavates TEC-des ja DC-des. Voolutsütomeetria analüüsis leiti, et Irf7 KO hiirte tüümuses on suurenenud koore TEC-ide populatsioon, kuid säsi TEC-de, tümotsüütide ja DC-de alampopulatsioonides muutusi ei leitud. Samuti ei nähtud erinevusi immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüsis DC-de ja TEC-ide paiknemises ning tüümuse morfoloogias. Sorditud TEC ja DC peal sooritatud geeniekspressiooni analüüsis leiti, et Irf7 KO hiirtes on vähenenud interferoonide Ifn β ja Ifn α ning kemokiinide Ccl5 (*C-C motif chemokine ligand 7*), Ccl25 ja Cxcl12 (*C-X-C motif chemokine ligand 12*) ekspressioon ja suurenenud Aire (*autoimmune regulator*) ekspressioon. Samuti selgus, et DC-d on tüümuses olulised Ifn β tootvad rakud.

Märksõnad: Irf7, Ifn β , tüümus, tümotsüüt, dendriitrakk, tüümuse epiteelirakk

CERCS: B500

Irf7 ja Ifn β function in thymocyte development directing thymic epithelial cells and dendritic cells

The thymus is a primary lymphoid organ, where immature T cells or thymocytes develop. T cells are critical to the adaptive immune system, where the body specifically eliminates foreign invaders and prevents their growth. Thymocyte development is directed by dendritic cells (DCs) and thymic epithelial cells (TECs). The aim of this bachelor's thesis was to find out the functions of Irf7 (interferon regulatory factor 7) and its target gene Ifn β (interferon β) in TECs and DCs.

To delineate the role of Irf7 and Ifn β in the thymus, we analyzed the thymi of WT (wild type) and Irf7-deficient (Irf7^{-/-}) mice. Our flow cytometric analysis showed an increase in cortical TEC numbers in Irf7^{-/-} thymi. However, we found no disturbances in the mature medullary TEC (mTEC) and DC compartments neither by flow cytometric nor immunofluorescence analysis. Our RT-qPCR analysis of FACS-sorted TECs and DCs revealed a decrease in the expression of chemokines Ccl5 (C-C motif chemokine ligand), Ccl25, Cxcl12 (C-X-C motif chemokine ligand 12) and interferons Ifn β , Ifn α and increase in Aire (autoimmune regulator) expression. Despite of changes in gene expression, flow cytometric analysis of both early and late stage thymocytes did not reveal any differences between WT and Irf7^{-/-} mice. We also identified DCs to be another major source of Ifn β in the thymus in addition to mTECs.

Key words: Irf7, Ifn β , thymus, thymocyte, dendritic cell, thymic epithelial cell

CERCS: B500

SISUKORD

INFOLEHT	2
SISUKORD.....	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Tüümus	8
1.2 Interferoon β	10
1.3 IRF7	11
2. EKSPERIMENTAALOSA	12
2.1 Töö eesmärgid	12
2.2 Materjalid ja metoodika	12
2.2.1 Hiired	12
2.2.2 Voolutsütomeetria ja rakkude sortimine	12
2.2.3 RNA puhastamine, cDNA süntees ja RT-PCR	15
2.2.4 Immuunfluorestsentsmikroskoopia	16
2.3 Tulemused.....	18
2.3.1 Irf7 mõjutab cTEC populatsiooni jaotust, kuid mitte mTEC-populatsiooni jaotust	18
2.3.2 Irf7 ei mõjuta UEA-1 ⁺ ja CD11c ⁺ rakkude paiknemist ega tüümuse morfoloogiat..	19
2.3.3 Irf7 ei mõjuta dendriitrakkudele populatsioonide jaotust.....	19
2.3.4 Irf7 ei mõjuta tümotsüütide diferentseerumist	20
2.3.5 Irf7 mõjutab TEC-ide ja dendriitrakkude geeniekspressiooni	21
2.4 Arutelu	24
KOKKUVÕTE	27
Summary.....	28

TÄNUSÕNAD	30
KIRJANDUSE LOETELU.....	31
LISAD	34
LISA 1. Tümonsüütide voolutsütomeetria tulemused.....	34
LIHTLITSENTS	35

KASUTATUD LÜHENDID

AIRE	autoimmuunregulaator (<i>autoimmune regulator</i>)
BSA	veise seerumi albumiin (<i>bovine serum albumin</i>)
B2m	β_2 mikroglobuliin (<i>β_2 microglobulin</i>)
CCL	C-C motiivi sisaldav kemokiin (<i>C-C motif chemokine ligand</i>)
CCR	C-C motiivi sisaldav kemokiini retseptor (<i>C-C motif chemokine receptor</i>)
CD	diferentseerumise klaster (<i>cluster of differentiation</i>)
cDC	konventsionaalne dendriitrakk (<i>conventional dendritic cell</i>)
CSN2	kaseiin 2 (<i>casein 2</i>)
cTEC	koore epiteelirakk (<i>cortical thymic epithelial cell</i>)
CXCL12	C-X-C motiivi sisaldav kemokiin (<i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i>)
DN	topeltnegatiivne (<i>double negative</i>)
DP	topeltposiitivne (<i>double positive</i>)
EDTA	etüleendiamiintetraatsetaat (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FBS	veise loote seerum (<i>fetal bovine serum</i>)
IFN	interferoon (<i>interferon</i>)
INS2	insuliin 2 (<i>insulin 2</i>)
IRF	interferooni regulaatorfaktor (<i>interferon regulatory factor</i>)
KO	geennokauditud (<i>knock-out</i>)
MHC	koesobivuskompleks (<i>major histocompatibility complex</i>)
mTEC	tuumuse säsi epiteelirakk (<i>medullary thymic epithelial cell</i>)
NGS	tavaline kitse seerum (<i>normal goat serum</i>)

PBS	fosfaadiga puhverdatud soolalahus (<i>phosphate-buffered saline</i>)
pDC	plasmatsütoidne dendriitrakk (<i>plasmacytoid dendritic cell</i>)
Qa2	<i>Qa lymphocyte antigen 2 region</i>
RB	<i>running buffer</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S100A8	<i>S100 calcium-binding protein A8</i>
SIRPα	<i>signal-regulatory protein alpha</i>
SP	<i>single positive</i>
TCR	T-raku retseptor (<i>T-cell receptor</i>)
T _{reg}	regulatoorne T-rakk (<i>regulatory T cell</i>)
TSA	koespetsiifiline antigeen (<i>tissue specific antigen</i>)
UEA-1	<i>Ulex europaeus agglutinin 1</i>
WT	metsiktüüp (<i>wild type</i>)

SISSEJUHATUS

Immuunsüsteem on organismi jaoks kriitilise tähtsusega elundkond, mis kaitseb teda patogeenide ja kasvajarakkude eest. Immuunsüsteemis eristatakse kaasasündinud immuunsust ning omandatud immuunsust. Kaasasündinud immuunsus on organismil esmane mehhanism haigusetekitajate vastu ning mis on kiire, ebaspetsiifiline ja järglastele päranduv. Kaasasündinud immuunsuse tagavad nii keha esmased kaitsetõkkeid (näiteks nahk, sülg ja limaskest), immuunrakud (näiteks dendriitrakud ja makrofaagid) ning mitte-spetsiifilised immuunreaktsioonid (näiteks paistetus ja palavik). Omandatud immuunsus on erinevalt kaasasündinud immuunsusest aeglasem, spetsiifilisem ja komplekssem. Omandatud immuunsus kujuneb selgroogsetel välja eluea jooksul, kus nakkuse läbipõdemise või vaktsineerimise tulemusena, tekivad haigusetekitaja spetsiifilised lümfotsüüdid – T- ja B-rakud. T- ja B-rakkude areng on keeruline protsess, mida hakati paremini mõistma alles eelmise sajandi lõpu poole. Lümfotsüütide areng algab luuüdis, kus vereloome tüvirakkudest arenevad küpsed B-rakud ning T-rakkude eellased, kes omakorda liiguvad tüümusesse ehk harkelundisse. Tüümuses toimub sinna migreerunud T-raku eellasrakude ehk tümotsüütide lõplik küpsemine T-rakkudeks. T-rakud on kriitilise tähtsusega rakud, kes suudavad vahet teha kehaomastel valkudel ning võõrvalkudel, mistõttu häired tüümuse talitluses võivad kaasa tuua tõsiseid autoimmuunhaigusi ja immuunpuudulikkuse. Seetõttu on oluline välja selgitada mehhanismid, mis reguleerivad tüümuses tümotsüütide arengut. Tümotsüütide arengus osalevad nii stroomarakud, nagu tüümuse epiteelirakud (*thymic epithelial cells*, TEC), kui ka leukotsüüdid, nagu dendriitrakud (*dendritic cells*, DC) (Murphy, 2012). Tümotsüütide arengut läbiviivad rakud ekspresseerivad palju erinevaid valke, mis on olulised tüümuse normaalseks funktsioneerimiseks ning käesoleva bakalaureusetöö fookuses on vähe uuritud transkriptsioonifaktor Irf7 (interferooni regulaatorfaktor 7, *interferon regulatory factor 7*) ning tema sihtmärkgeen *Ifn β* (interferoon β , *interferon β*).

Uurimistöö eesmärk on uurida Irf7 KO (geennokauditud, *knock-out*) ja metsiktüüpi (*wild type*, WT) hiirte tüümuseid ning välja selgitada Irf7 ja *Ifn β* funktsioon TEC-des ja dendriitrakkudes ning millist mõju avaldab Irf7 puudulikkus tümotsüütide arengule.

Bakalaureusetöö koostati Bio- ja SiirdemeditSiini instituudis Molekulaarpatoloogia uurimisgrupis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Tüümus

Tüümus ehk harkelund on immuunsüsteemi üks tähtsamatest organitest, kus toimub T-rakkude areng luuüdi päritolu vereloome tüvirakkudest küpseteks T-rakkudeks (Gotter ja Kyewski, 2004). T-rakud on omandatud immuunsüsteemi kesksed rakud, mis tunnevad ära teiste rakkude pinnal olevate MHC-molekulide (koesobivuskompleks, *major histocompatibility complex*) vahendusel esitatud võõrvalke ja initsieerivad nende rakkude vastu immuunvastuse.

Tüümus on kahest sagarast koosnev organ, mis asub rinnaku taga. Sagarad ise koosnevad väiksematest sagarikest, mille seesmises osas saab eristada sisemist säsiosa ehk medullat ja välimist kooreosa ehk korteksit. Tüümus sisaldab põhiliselt tümotsüüte ehk ebaküpseid T-rakke ning veel tüümuse epiteelirakke, dendriittrakke ja B-rakke, mis osalevad T-rakkude küpsemises (Murphy, 2012). Tüümuse epiteelirakud jaotatakse kaheks põhipopulatsiooniks: säsiosas paiknevad säsi epiteelirakud (*medullary TEC*, mTEC) ja kooreosas paiknevad koore epiteelirakud (*cortical TEC*, cTEC) (Klein *et al.*, 2014).

Tümotsüüdi arengut saab jaotada kahe pinnamarkeri CD4 ja CD8 (diferentseerumise klaster, *cluster of differentiation*) alusel kolmeks: CD4⁻CD8⁻ DN (topeltnegatiivne, *double negative*), CD4⁺CD8⁺ DP (topeltpositiivne, *double positive*) ja CD4⁺ või CD8⁺ SP (*single positive*) etapid (Murphy, 2012). Tümotsüütide diferentseerumist ja liikumist juhivad TEC-ide ja dendriitrakkude rakkude omavahelised interaktsioonid ning stroomarakkude poolt toodetud erinevad molekulid nagu näiteks kemokiinid CCL5 (C-C motiivi sisaldav kemokiin, *C-C motif chemokine ligand*), CCL19, CCL25 ja CXCL12 (C-X-C motiivi sisaldav kemokiin, *C-X-C motif chemokine ligand 12*) (Halkias *et al.*, 2013; Ueno *et al.*, 2002; Vicari *et al.*, 1997 ja Zaballos *et al.*, 1999).

Tümotsüütide areng algab DN etapiga, kus CD4⁻CD8⁻ eellasrakud sisenevad verest tüümusesse säsi ja koore piirialale ja liiguvad sealt edasi koore poole. DN arenguetappe tuvastatakse pinnamarkerite CD25 ja CD44 alusel (Murphy, 2012). DN algusetapis hakkavad tümotsüüdid ekspresseerima kemokiini retseptorit CCR6 (C-C motiivi sisaldav kemokiini retseptor 6, *C-C motif chemokine receptor 6*), mis juhib tümotsüütide migratsiooni ja

diferentseerumist (Bunting *et al.*, 2014). DN ja sellele järgnevas DP etapis toimub T-raku retseptori geenide juhuslik rekombinatsioon, mille õnnestumisel tekib T-raku pinnale T-raku retseptor (*T-cell receptor*, TCR). cTEC-id mõjutavad tümotsüütide arengut ja paljunemist DN ning DP faasis, viies läbi tümotsüütide positiivset selektsiooni. Positiivne selektsioon on protsess, kus lastakse areneda ainult neil T-rakkudel, mille TCR tunneb ära cTEC-i pinnal olevat MHC molekuli ja antigeeni kompleksi. Antigeeniks nimetatakse igat molekuli, mis spetsiifiliselt seondub B-rakkude poolt toodetud antikehadega või valku, mis spetsiifiliselt seondub T-raku retseptoriga (Murphy, 2012). Positiivselt selekteeritud tümotsüüdid hakkavad ekspresseerima retseptorit CCR7 (*C-C motif chemokine receptor 7*) ning nad liiguvad edasi säsisse, kus tümotsüüdid diferentseeruvad kas CD8⁺ või CD4⁺ SP T-rakkudeks (Bosselut, 2004 ja Kwan ja Killeen, 2004). Tümotsüütide viimastes arenguetappides hakkavad SP rakud ekspresseerima Qa2 retseptorit (*Qa lymphocyte antigen 2 region*), mis on küpsete T-rakkude tunnuseks (Vernachio *et al.*, 1989).

Säsiosas paiknevad mTEC-id ja dendriitrakud viivad läbi tümotsüütide negatiivset selektsiooni. Negatiivse selektsiooni käigus elimineeritakse autoreaktiivsed tümotsüüdid, millel on kõrge afiinsus mTEC-de ja dendriitrakkude pinnal esitletavate MHC-autoantigeen-ehk kehaomaste valgukomplekside suhtes. Negatiivse selektsiooni käigus suunatakse enamik rakke apoptoosi ning tühimusest väljuvad reeglina kehaomaseid antigeene mitteäratundvad tsütotoksilised CD8⁺ T-rakud või CD4⁺-T-abistajarakud. Tsütotoksilised CD8⁺ T-rakud on rakud, kes on võimelised põhjustama nakatunud somaatilistes rakkudes ja vähirakkudes apoptoosi ning aktiveerima immuunsüsteemi. CD4⁺-T-abistajarakud on väga heterogeenne grupp rakke, kes toodavad tsütokiine, millega nad reguleerivad immuunsüsteemi. Osa autoreaktiivsetest CD4⁺ SP tümotsüütidest areneb kehaomaste antigeenide suhtes immuunvastust maha suruv reguloorne T-rakkude populatsioon (*regulatory T cell*, T_{reg}) (Murphy, 2012).

mTEC-id jaotatakse pinnamarkerite ekspressiooni alusel kaheks: mTEC^{low}-populatsioon, mille rakupinnal on madal MHC II ja kostimulatoorse CD80-valgu ekspressioon, ning antigeene esitlev mTEC^{high}-populatsioon, mille pinnal on vastavate molekulide ekspressioon kõrge (Gray *et al.*, 2006). mTEC^{high} on peamine tümotsüütide negatiivse selektsiooni eest vastutav rakupopulatsioon ning tema omapäraks on see, et ta ekspresseerib pea kõiki organismile omaseid koespetsiifilisi antigeene (*tissue specific antigen*, TSA) (Chan ja Anderson, 2015). Suure osa koespetsiifiliste antigeenide ekspressiooni eest vastutab neis

rakkudes transkriptsiooniregulaator AIRE (autoimmuunregulaator, *autoimmune regulator*), mis aktiveerib koespetsiifiliste valkude geenide transkriptsiooni (Liston *et al.*, 2003), nagu *INS2* (insuliin 2, *insulin 2*) (Yano *et al.*, 2008), *S100A8* (*S100 calcium-binding protein A8*) (Abramson *et al.*, 2010) ja *CSN2* (kaseiin 2, *casein 2*) (Derbinski *et al.*, 2008).

mTEC-ide kõrval on tüümuses negatiivset selektsiooni läbiviivateks rakkudeks dendriitrakud (Klein *et al.*, 2011). Tüümuse rakkudest moodustuvad dendriitrakud umbes 0,5% (Wu ja Shortman, 2005) ning selles organis eristatakse kolme põhilist dendriitrakupopulatsiooni: tüümusesse migreerunud $\text{SIRP}\alpha^+$ (*signal-regulatory protein alpha*) ja tüümuses resideeruvad $\text{SIRP}\alpha^-$ konventsionaalsed dendriitrakud (*conventional dendritic cell*, cDC) ning tüümusesse migreerunud plasmatsütoidsed dendriitrakud (*plasmacytoid dendritic cell*, pDC) (Vremec *et al.*, 2000 ja Porritt *et al.*, 2003), mis kõik ekspresseerivad dendriitrakkudele omast pinnamarkerit CD11c (Murphy, 2012). $\text{SIRP}\alpha^+$ dendriitrakud ja plasmatsütoidsed dendriitrakud esitlevad tümotsüütidele perifeersetest kudedest pärinevaid ja $\text{SIRP}\alpha^-$ dendriitrakud tüümusest pärinevaid antigeene (Hadeiba ja Butcher, 2013 ja Hasegawa ja Matsumoto, 2018). Perifeersetes kudedes ekspresseerivad dendriitrakud viirusnakkuse korral 1. tüüpi interferoone, nagu $\text{IFN}\alpha$ ja $\text{IFN}\beta$, ning 2. tüüpi interferoone, nagu $\text{IFN}\gamma$, kuid tüümuses pole kuigi palju teada ei dendriitrakkude ega ka interferoonide rollist tümotsüütide küpsemise suunamisel (Murphy, 2012 ja Pan *et al.*, 2004).

1.2 Interferoon β

Interferoon β on signaalvalk, mis kuulub koos $\text{IFN}\alpha$ -ga 1. tüüpi interferoonide hulka (Chen *et al.*, 2004). $\text{IFN}\beta$ rolli on uuritud kõige rohkem perifeerses immuunsüsteemis, kus viirusinfektsioonide puhul suureneb dendriitrakkudes $\text{IFN}\beta$ ekspressioon ja sekretsioon (McInerney *et al.*, 2005), mis takistab viiruste levikut ja paljunemist, aktiveerides näiteks geene, mis viib viirusega nakatunud raku apoptoosi (Le Bon *et al.*, 2001 ja Montoya *et al.*, 2002). Kõige rohkem toodavad $\text{IFN}\beta$ ja teisi 1. tüüpi interferoone plasmatsütoidsed dendriitrakud (Kawai ja Akira 2006). $\text{IFN}\beta$ osaleb peale immuunvastuste ka organogeneesis (Takayanagi *et al.*, 2002 ja Deonarain *et al.*, 2003) ja vähitekkes (Gresser *et al.*, 2002). Perifeerse immuunsüsteemi rakkudes reguleerivad 1. tüüpi interferoonide ekspressiooni IRF-perekonna transkriptsioonifaktorid (Ikushima *et al.*, 2013).

Varasemalt on näidatud, et hiire mTEC-id on tüümuses põhilised IFN β tootvad rakud ning Aire KO hiirtes on tüümustes vähenenud konstitutiivne IFN β tootmine (Lienenklaus *et al.*, 2009). On näidatud, et mTEC^{high}-populatsioonis sõltub Ifn β ekspressioon transkriptsioonifaktorist Irf7, kuid pole teada, mis rolli need molekulid TEC-ides omavad (Otero *et al.*, 2013).

1.3 IRF7

IRF7 on üks üheksast IRF-perekonda kuuluvast transkriptsioonifaktorist (Nguyen *et al.*, 1997). IRF-ide põhifunktsiooniks on reguleerida immuunvastuses osalevate 1. tüüpi interferoonide tootmist (Paun ja Pitha, 2007). IRF-id võivad täita ka muid funktsioone, näiteks reguleerida rakkude diferentseerumist, onkogeneesi, tsütokiinide tootmist ja apoptoosi (Savitsky *et al.*, 2010; Takaoka *et al.*, 2008, Tamura *et al.*, 2008; Tanaka ja Taniguchi, 2000 ja Gabriele ja Ozato, 2010).

IRF7 leidub paljudes rakkudes, kuid enim on seda valku uuritud immuunrakkudes (Ning *et al.*, 2011). IRF7 on immuunrakkude, nagu näiteks dendriitrakkude, tsütoplasmas inaktiivse vormina. Viiruslikku päritolu nukleiinhapet äratundvad mehhanismid viivad IRF7 aktiveerimiseni ja selle valgu siirdumiseni tuuma, kus see seondub teiste valkudega ning moodustub valgukompleks. Valgukompleks omakorda seondub oma sihtmärkgeenide promootoritele ja reguleerib nii transkriptsiooni, aktiveerides näiteks 1. tüüpi interferoonide tootmist (Ikushima *et al.*, 2013).

IRF7 rolli tüümuses on väga vähe uuritud. Hetkel on avaldatud ainult üks uurimistöö Irf7 rollist hiire tüümuses, kus leiti, et Irf7 KO hiirtes on väiksemad säsisaared ning vähem küpseid UEA-1⁺ (*Ulex europaeus agglutinin 1*) AIRE⁺, seega Irf7 on vajalik mTEC-ide küpsemiseks (Otero *et al.*, 2013).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

Antud uurimistöö eesmärgiks oli välja selgitada Irf7-transkriptsioonifaktori ja tema sihtmärkgeeni Ifn β roll tümotsüütide arengu eest vastutavates tükimuse epiteelirakkudes ja dendriitrakkudes.

2.2 Materjalid ja metoodika

2.2.1 Hiired

Uurimistöös kasutati uuritava rühmana Irf7 KO hiiri ja nende kontrollrühmana C57BL/6J metsiktüüpi hiiri. Katsetes kasutati võrdselt nii emaseid kui ka isaseid hiiri, kes olid 5–7 nädala vanused. Irf7 KO hiired telliti mittetulundusühingult Jackson Laboratories ning nad kasvatati üles Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonna Bio- ja Siirdemeditsiini Instituudi vivaariumis. Hiirte hukkamiseks kasutati tservikaalset dislokatsiooni.

2.2.2 Voolutsütomeetria ja rakkude sortimine

Voolutsütomeetrias ja rakkude sortimisel kasutatud antikehad on välja toodud tabelis 1. Kõigis katsetes inkubeeriti rakke 2.4G2 hübridoomi kasvatamisel kasutatud söötmes. 2.4G2 hübridoom sekreteerib söötmesse IgG-retseptoreid CD16 ja CD32 blokeerivaid antikehi, mis vähendab IgG-tüüpi antikehade ebaspetsiifilist seondumist. Rakkude sõelumisel kasutati 100 μ m silmaga sõelu (Thermo Fisher Scientific). Rakud loendati rakulugemiskambri ehk hematsütomeetriga, kasutades Baulbrandi lugemiskambrit. Elusate rakkude eristamiseks surnutest kasutati trüpaansinist (Thermo Fisher Scientific).

Tükimuse epiteelirakkude sortimiseks ja voolutsütomeetri analüüsi tegemiseks viidi läbi eelnevalt rikastamine. Rikastamise käigus hakiti tükimused umbes 2 mm³ suurusteks tükkideks ning koetükid pandi 50 ml 2% FBS (*fetal bovine serum*, Gibco) sisaldusega RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Thermo Fisher Scientific) söötmesse. Koetükke suspendeeriti seroloogilise pipetiga üles-alla 20 korda, seejärel lasti tükimuste tükkidel 5 min põhja settida, misjärel peamiselt tümotsüüte sisaldav supernatant eemaldati ja lisati uus sööde. Sama tsüklit teostati 5–6 korda. Seejärel korrati tsüklit veel 3–4 korda, kasutades

suspendeerimiseks 15 ml söödet. Üherakulise suspensiooni saamiseks inkubeeriti koetükke esmalt 20 min 37 °C PBS-is (fosfaadiga puhverdatud soolalahus, *phosphate-buffered saline*, Naxo), mis sisaldas 125 U/ml kollagenaasi II (Gibco) ja 15 U/ml DNAasi I (Appllichem). Pärast esimest seedimist eemaldati põhiliselt tümotsüüte sisaldav supernatant ja lisati RPMI-söötmes kollagenaas II ja DNAas I samas kontsentratsioonis, kuid lisaks veel 0,75 U/ml dispaasi (Gibco) ning proove inkubeeriti 20 min 37 °C. Supernatant eemaldati ning proove inkubeeriti samade lisanditega lahuses 37 °C juures, kuni tüümuse tükid olid täielikult üherakuliseks suspensiooniks lahutatud. Rakususpensioon sõeluti, loendati ning teostati blokeerimine 2.4G2 söötmega. Seejärel hoiti rakke vastavate antikehadega 20 minutit 4 °C juures. Tüümuse epiteelirakud sorditi pinnamarkerite alusel 4 fraktsiooni: cTEC, mTEC^{high}, mTEC^{low} ja DC. cTEC fraktsiooni sorditi CD45⁻, CD11c⁻, EpCam⁺, UEA^{low}, Ly51⁺ rakud, mTEC^{high} fraktsiooni sorditi CD45⁻, CD11c⁻, EpCam⁺, UEA-1⁺, Ly51⁻, MHC II^{high} rakud, mTEC^{low} fraktsiooniks sorditi CD45⁻, CD11c⁻, EpCam⁺, UEA-1⁺, Ly51⁻, MHC II^{low} rakud ja DC fraktsiooniks sorditi CD45⁺, CD11c⁺ rakud. Sellise rikastamise käigus jäävad DC-fraktsiooni peamiselt SIRPα⁺ ja SIRPα⁻ dendriitrakud ja puuduvad pDC, kuna nad pestakse rikastamise käigus välja (Schraml *et al.*, 2015).

Tüümuse dendriitrakkude rikastamisel homogeniseeriti tüümused mikroskoobi alusklaaside vahel ning rakkude loendamise ja 2.4G2 söötmega blokeerimise järel lisati 10⁷ raku kohta 90 µl RB puhvrit (*running buffer*; 0,5% BSA (veise seerumi albumiin, *bovine serum albumin*, GE Healthcare) ja 0,002% EDTA (etüleendiamiintetraatsetaat, *ethylenediaminetetraacetic acid*, AppliChem) PBS-puhvris). Seejärel tsentrifuugiti rakud põhja 5 min 350 x g, eemaldati supernatant ja 10⁷ raku kohta lisati 50 µl CD11c Pan MicroBeads Mouse magnetkerasid ning proove inkubeeriti 15 min 4 °C juures. Proove tsentrifuugiti 5 min 350 x g, eemaldati supernatant ning 500 µl 10⁸ raku kohta võeti 500 µl RB puhvrit ja rakud sorditi Automacs Pro magnetsorteriga (Miltenyi Biotec), kasutades Possel_s programmi. Rakususpensioon sõeluti, rakud loendati ning inkubeeriti vastavate antikehadega 30 minutit 4 °C juures. CD11c-positiivne fraktsioon sorditi alampopulatsioonideks järgnevate markerite alusel: SIRPα⁺ fraktsiooniks sorditi B220⁺, MHC II^{high}, CD11c⁺, CD45⁻, CD68⁺, SIRPα⁺ rakud; SIRPα⁻ fraktsiooniks sorditi B220⁺, MHC II^{high}, CD11c⁺, CD45⁺, CD68⁺, SIRPα⁻ rakud ning pDC-d sorditi B220⁺, MHC II^{int}, CD11c⁺, SIRPα^{int}.

Tümotsüütide analüüsiks homogeniseeriti tüümused mikroskoobi alusklaaside vahel 2% FBS sisaldusega RPMI söötmes. Rakususpensioon sõeluti, rakud loendati, blokeeriti 2.4G2 söötmega ja inkubeeriti vastavate antikehadega 30 min 4 °C.

Kõikide sortimiste jaoks kasutati BD FACSAria (BD) rakusorterit ja rakud sorditi katsutitesse, mis sisaldasid 1 ml LS TriZol reagenti (Invitrogen). Voolutsütomeetriaks kasutati LSRFortessa analüsaatorit (BD) ning kõigi katsete analüüsiks kasutati FACSDiva programmi (BD). Graafikute visualiseerimiseks kasutati Graphpad Prism 5 programmi. Tulemuste analüüsiks tehtud tulpdiaграмmid kujutavad keskmistatud tulemusi koos standardveaga ja statistilise olulisuse määramiseks kasutati t-test mitte-paarikaupa andmetele, kus $p < 0,5$.

Tabel 1: uurimistöös kasutatud antikehad

Antigeen	Antikeha kloon	Konjugaat	Kontsentratsioon	Firma
B220	RA3-6B2	BV650	1:100	Biolegend
BPI	6C3	PE	1:50	eBioscience
CCR6	29-2L17	PE	1:50	Biolegend
CCR7	4B12	biot	1:100	Biolegend
CD11c	N418	BV421	1:100	Biolegend
CD11c	N418	BV421	1:100	Biolegend
CD19	1D3	FITC	1:200	BD Biosciences
CD24	M1/69	PerCP-Cy5.5	1:50	Biolegend
CD25	PC61.5	APC	1:200	eBioscience
CD3e	145-2C11	PerCP-Cy5.5	1:100	eBioscience
CD4	GK1.5	AF700	1:200	eBioscience
CD4	GK15	Alexa Fluor 700	1:100	Biolegend
CD44	IM7	PerCPCy5.5	1:200	eBioscience
CD44	IM7	PE	1:200	eBioscience
CD45	30-F11	PerCP-Cy55	1:200	eBioscience
CD62L	145.2C11	Pe-Cy7	1:200	eBioscience
CD68	FA-11	PerCP-Cy5.5	1:200	Biolegend
CD69	H1.2F3	FITCH	1:200	eBioscience
CD8a	53-6.7	BV510	1:100	Biolegend
CD8a	53-6.7	FITCH	1:200	Biolegend
CD8a	53-6.7	BV 650	1:400	Biolegend
Ep-CAM	G8.8	Pe-Cy7	1:200	eBioscience
F4/80	BM8	Pe-Cy7	1:200	Biolegend
Foxp3	FJK-16s	FITC	1:100	eBioscience
Helios	22F6	APC	1:50	eBioscience
Ki67	B56	PE	1:50	BD Biosciences
MHC II	M5/114.15.2	BV510	1:100	Biolegend

MHC II	M5/114.15.2	APC	1:200	Biolegend
Nrp1	3E12	BV421	1:100	Biolegend
Qa2	695H1-9-9	PE	1:200	Abcam
SA	Streptavidin	APC	1:100	Biolegend
Sirp α	P84	PE	1:100	Biolegend
TCRb	H57-597	PE-Cy5	1:200	BD biosciences
UEA-1*	Lektiin	FITC	1:100	Vector labs

*UEA-1 ehk *Ulex europaeus agglutinin 1* ei ole antikeha, vaid astelhernest pärinev agglutiniin, mis seondub tüümuse epiteelil senituvastamata glükoproteiinide ja lipiididega.

2.2.3 RNA puhastamine, cDNA süntees ja RT-PCR

RNA eraldati LS TriZoli sorditud rakkudest RNeasy Micro Kiti (Qiagen) ametliku protokoll järgi. Selleks lisati rakuproovidesse 200 μ l kloroformi ning seejärel inkubeeriti 2–3 min toatemperatuuril. Proove tsentrifuugiti 15 min 12000 x g 4 °C juures. Vesifaas koguti uude tuubi ja sinna lisati prooviga võrdses ruumalas 70% etanooli. Edasi kanti lahused eralduskolonnile ja tsentrifuugiti toatemperatuuril 15 s 8000 x g. Kolonni lisati 350 μ l puhvrit RW1 ja tsentrifuugiti 15 s 8000 x g. Proove inkubeeriti 15 min toatemperatuuril DNAas I-ga (Qiagen). Kolonni lisati 350 RW1-puhvrit ja tsentrifuugiti 15 s 8000 x g. Seejärel lisati 500 μ l RW1, kolonnile pandi alla uus 2 ml tuub ning tsentrifuugiti 15 s 8000 x g. Lisati 500 μ l 80% etanooli ja tsentrifuugiti 2 min 8000 x g. Kolonnidele pandi alla uued 2 ml tuubid, kaas jäeti lahti ja tsentrifuugiti 5 min 16000 x g. Kolonnidele pandi alla uued 1,5 ml katsutid, lisati 14 μ l vett ja tsentrifuugiti 1 min 16000 x g.

cDNA sünteesiks lisati 10 μ l RNA proovile 1 μ l 500 μ g/ml oligo(dT) praimerit (Invitrogen), 1 μ l 10 mM dNTP segu (Fermentas) ning proove inkubeeriti praimerite seondumiseks 5 min 65 °C ning seejärel hoiti proove vähemalt 1 min jääl. Proovidele lisati 4 μ l 5 \times First Strand puhvrit (Invitrogen), 1 μ l 0,1 M DTT (Invitrogen), 1 μ l 40 U/ μ l ribonukleaasi inhibiitorit RiboLock (Fermentas) ja 1 μ l 200 U/ μ l SuperScript III pöördtranskriptaasi (Invitrogen). cDNA sünteesiks inkubeeriti proove 60 min 50 °C juures ning ensüümi inaktiveerimiseks 15 min 70 °C juures. cDNA säilitati -20 °C juures.

RT-PCR läbiviimisel kasutati ViiA7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) masinat. Uurimistöös kasutatud praimerid on toodud välja tabelis 2. Proovid kanti 384 auguga qPCR plaadile (Applied Biosystems) 10 μ l kaupa kolme paralleelse kordusena, kus iga 10 μ l proov

sisaldas 0,5 µl cDNA-d, 9,3 µl 2× Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix-i (ThermoFisher Scientific) 0,1 µl 5 mM *reverse* praimerit ja 0,1 µl 5 mM *forward* praimerit. Tulemused normaliseeriti koduhoidja geeni *B2m* (β_2 mikroglobuliin, *β_2 microglobulin*) ekspressiooni järgi ning analüüsiti $\Delta\Delta C_t$ meetodiga.

Tabel 2: uurimistöös kasutatud praimerid

Praimer (F – <i>forward</i>/R – <i>reverse</i>)	Järjestus	Geen
CCL19atg F	CTGCCTCAGATTATCTGCCAT	Ccl19
CCL19atg Rnew	CTTCCGCATCATTAGCACCC	Ccl19
CCL25 F	GTGCTGTGAGATTCTACTTCC	Ccl25
CCL25 R	TATGGTTTGACTTCTTCCTTTCAG	Ccl25
CCL5 F	GTGCCCACGTCAAGGAGTAT	Ccl5
CCL5 R	CCCACTTCTTCTCTGGGTTG	Ccl5
Csnb F	GGCACAGGTTGTTCAAGGCTT	Csn2
Csnb R	AAGGAAGGGTGCTACTTGCTG	Csn2
Ifna4 F	CCTGGTAATGATGAGCTACTACTGGT	Ifna4
Ifna4 R	ATTTCTTCCAGGACTGTCAAGGC	Ifna4
mAire3/4 F	TGGTCTGAATTCCGTTTCCA	Aire
mAire3/4 R	CCTCAAAGAGCGTCTCCAG	Aire
mB2m F	TGAGACTGATACATACGCCTGCA	B2m
mB2m R	GATGCTTGATCACATGTCTCGATC	B2m
mIFNbF	TACGTCTCCTGGATGAACTCCAC	Ifnb1
mIFNbR	TGAGGACATCTCCCACGTCA	Ifnb1
mIFNg F	GCCATCAGCAACAACATAAGC	Ifng
mIFNg R	GGTTGTTGACCTCAAACCTTGG	Ifng
mIns2 F1	GCTTCTTCTACACCCCATGTC	Ins2
mIns2 R1	AGCACTGATCTACAATGCCAC	Ins2
S100A8 F	TTTGTGAGCTCCGTCTTCAA	S100a8
S100A8 R	AGACAGTCACATAGCCCTAC	S100a8

2.2.4 Immuunfluorestsentsmikroskoopia

Immuunfluorestsentsmikroskoopias kasutatud preparaate tegemiseks eemaldati tüümuse sagarad ning need pandi Neg 50 (Richard-Allan Scientific) lahusega täidetud vormidesse, mis seejärel külmutati kuiva jää ja 96% etanooli segu peal. Koelõigud lõigati Leica CM 1950 krüostaadiga 5 µm paksusteks.

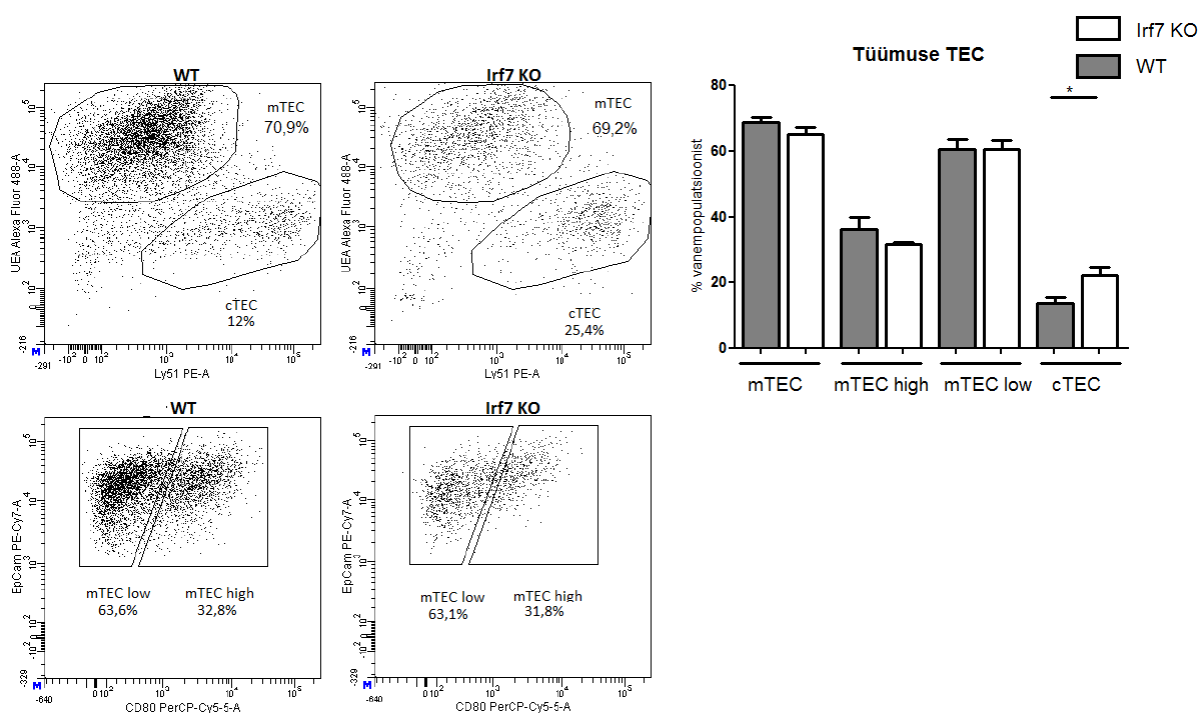
Tüümuselõigud fikseeriti 15 min 4% formaldehüüdiga, misjärel fikseeritud lõigud pesti 3x5 min PBS-puhvriga ja seejärel permeabiliseeriti 15 min 0,3% TritonX100 (Applichem) ning

1% BSA PBS-puhvris. Antikehade ebaspetsiifilise seondumise vähendamiseks inkubeeriti koelõike 30 min 1% NGS (tavaline kitse seerum, *normal goat serum*) (Dako Cytomation) lahuses PBS-sis. Pärast blokeerimist loputati koelõike PBS-puhvris. Seejärel viidi läbi 15 h pimedas +4 °C juures koelõike värving FITC-konjugeeritud UEA-1 (*Ulex Europeus Agglutinin 1*) (Vector labs) lahjendusega 1:100 või FITC-ga konjugeeritud CD11c (N418) (Biolegend) lahjendusega 1:200, mis olid 1% NGS ja 0,1% TritonX100 PBS-puhvris. Pärast antikehadega töötlust pesti lõike 3x10 min PBS-puhvris ning töödeldi toatemperatuuril 10 min 2 µg/ml DAPI-ga (Roche diagnostics Corporation) ja pesti 10 min PBS puhvriga. Katteklaasid kinnitati alusklaasile sulundusvedelikuga Fluorescent Mounting Medium (Dakocytomation). Mikroskoopimisel kasutati Leica 310 FX fluorestsentsmikroskoopi ning pilte töödeldi Leica Application Suite X programmiga.

2.3 Tulemused

2.3.1 *Irf7* mõjutab cTEC populatsiooni jaotust, kuid mitte mTEC-populatsiooni jaotust

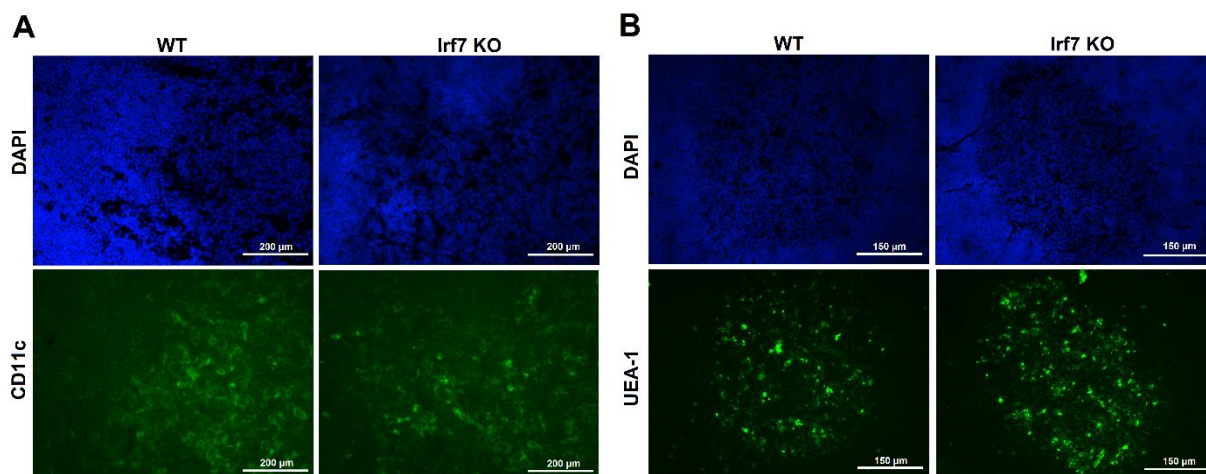
Eelnevalt on ära näidatud, et *Irf7* KO tüümuse säsisaared on väiksemad ning need sisaldavad vähem küpseid UEA-1⁺ AIRE⁺ mTEC rakke, mis viitab häirele mTEC-ide diferentseerumises. Kontrollimaks, kuidas *Irf7* puudulikkus mõjutab TEC-ide arengut, teostati voolutsütomeetria analüüs, kus vaadati WT ja *Irf7* KO hiirte tüümuste cTEC, mTEC ning mTEC^{high} ja mTEC^{low} populatsioonide jaotust. Selgus, et *Irf7* KO hiirtes oli cTEC populatsiooni osakaal 60% võrra suurenenud võrreldes WT loomadega. Küll aga ei leitud erinevusi mTEC-ide populatsioonis, mis olid katses UEA-1-ga märgistatud, ega erinevusi mTEC^{high} ja mTEC^{low} populatsioonides (joonis 1).



Joonis 1: WT ja *Irf7* KO tüümuste TEC-ide alampopulatsioonide, mTEC, mTEC^{high}, mTEC^{low} ja cTEC, voolutsütomeetriline analüüs. Vasakul pool on uuritavate rakupopulatsioonide *dot plot* graafikud ning paremal pool uuritavade rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud tulpdiaграмmid. Eksperimendis analüüsiti individuaalselt 2 WT ja 3 *Irf7* KO hiire tüümust. Statistilise olulisuse ($p < 0,5$) määramiseks kasutati t-testi mitte-paarikaupa andmetele. Tulpdiaграмmidel on statistiliselt oluline leid tähistatud tärniga.

2.3.2 Irf7 ei mõjuta UEA-1⁺ ja CD11c⁺ rakkude paiknemist ega tuumuse morfoloogiat

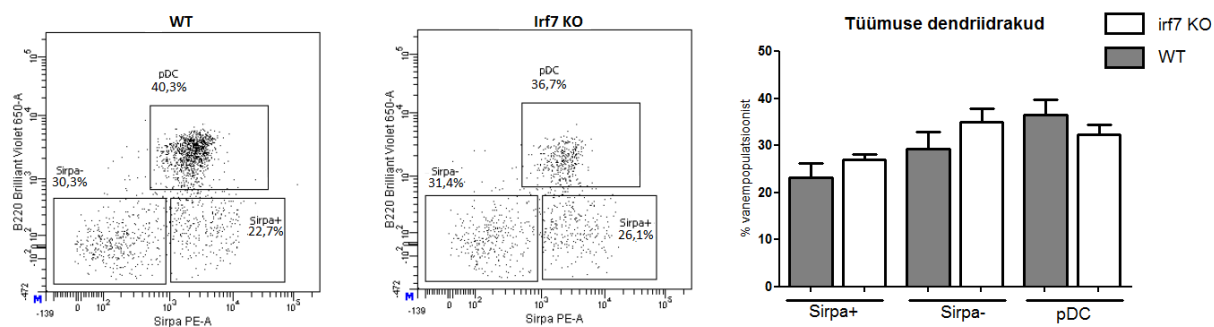
Varasemalt on näidatud, et Irf7 KO hiirte tuumuste säsis on vähem UEA-1 mTEC-e ja et nende hiirte tuumuste säsisaared on väiksemad (Otero *et al.*, 2013). Samas, Irf7 KO ja WT tuumuslõikude immuunfluorestsismikroskoobiga vaatlemisel ei nähtud erinevusi UEA-1⁺ rakkude paiknemisel ja UEA-1 signaali tugevusel ega säsisaarte suurustel, arvukusel jt morfoloogilistes omadustes. Samuti ei nähtud erinevusi CD11c ekspresseerivate dendriitrakkude paiknemises (joonis 2).



Joonis 2: immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüs DAPI, CD11c (dendriitrakkude marker) ja UEA-1-ga (küpsete mTEC-de marker) märgistatud hiirte tuumuse koelõikudele. Paneel A kujutatud fotod on tehtud 252x suurendusega ja paneel B kujutatud fotod on tehtud 397x suurendusega. Paneelil A kujutatud pildid pärinevad ühest katsest, kus kasutati 5 WT ja 5 Irf7 KO hiirt. Paneelil B kujutatud pildid esindavad kaht eraldiseisvat katset, kus ühes katses kasutati 4 WT ja 4 Irf7 KO hiirt, teises 5 WT ja 5 Irf7 KO hiirt. UEA-1 signaali tugevuse usaldusväärsemaks hindamiseks oli ühel mikroskoobi alusklaasil nii WT kui ka Irf7 koelõigud.

2.3.3 Irf7 ei mõjuta dendriitrakkude populatsioonide jaotust

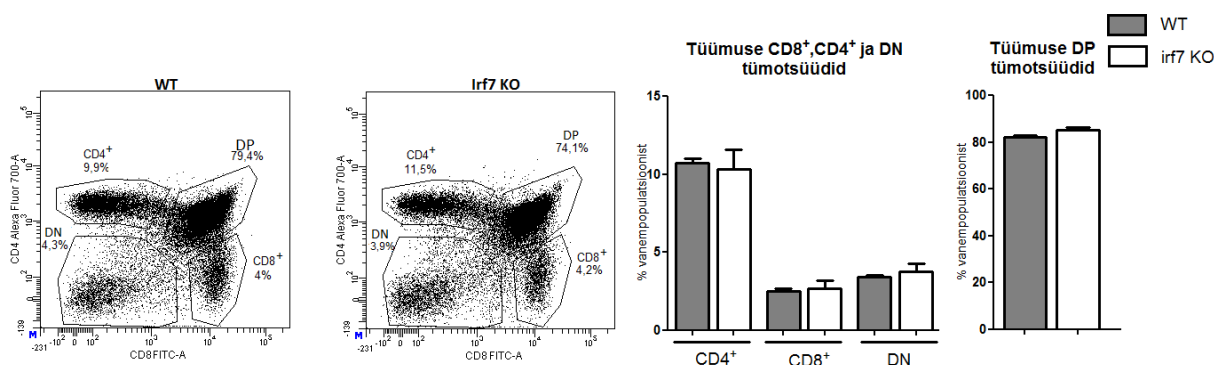
Selleks, et välja selgitada kuidas Irf7 puudulikkus mõjutab hiirte tuumustes dendriitrakkude populatsioone, teostati voolutsütomeetrilisi analüüse, kus võrreldi omavahel Irf7 KO ja WT hiirte tuumuste dendriitrakkude kolme põhilist populatsiooni: Sirpα⁺, Sirpα⁻ ja pDC. Kuigi rakupopulatsioonides võis tähedada teatavaid muutuste trende, siis statistiliselt olulisi erinevusi ei tuvastatud (joonis 3).



Joonis 3: WT ja Irf7 KO tüümuste dendriitrakkude alampopulatsioonide Sirpα⁺, Sirpα⁻ ja pDC voolutsütomeetriline analüüs. Vasakul pool on uuritavate rakupopulatsioonide *dot plot* graafikud ning paremal pool uuritavade rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud tulpdiaграмmid. Joonisel kujutatud pildid esindavad kaht eraldiseisvat katset, kus mõlemas katses kasutati 4 WT ja 4 Irf7 KO hiirt. Eksperimendis analüüsiti individuaalselt 4 WT ja 4 Irf7 KO hiirt. Statistilise olulisuse määramiseks ($p < 0,5$) kasutati t-testi mitte-paarikaupa andmetele.

2.3.4 Irf7 ei mõjuta tümotsüütide diferentseerumist

Teada saamaks, kas Irf7 puudulikkus mõjutab tümotsüütide arengut, tehti Irf7 KO ja WT hiirte tüümusest voolutsütomeetrilisi analüüse, kus vaadati erinevates diferentseerumise järkudes olevate tümotsüütide alampopulatsioone. Selgus, et CD4 ja CD8 pinnamarkerite järgi eristuvates CD4⁺- ja CD8⁺-positiivsete, DP ning DN tümotsüütide põhipopulatsioonides erinevusi ei esine (joonis 4).



Joonis 4: WT ja Irf7 KO tüümuste tümotsüütide nelja põhipopulatsiooni – DP, DN, CD4⁺ ja CD8⁺ T-rakud – voolutsütomeetriline analüüs. Vasakul pool on uuritavate rakupopulatsioonide *dot plot* graafikud ning paremal pool uuritavade rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud tulpdiaграмmid. Eksperimendis analüüsiti individuaalselt 4 WT ja 4 Irf7

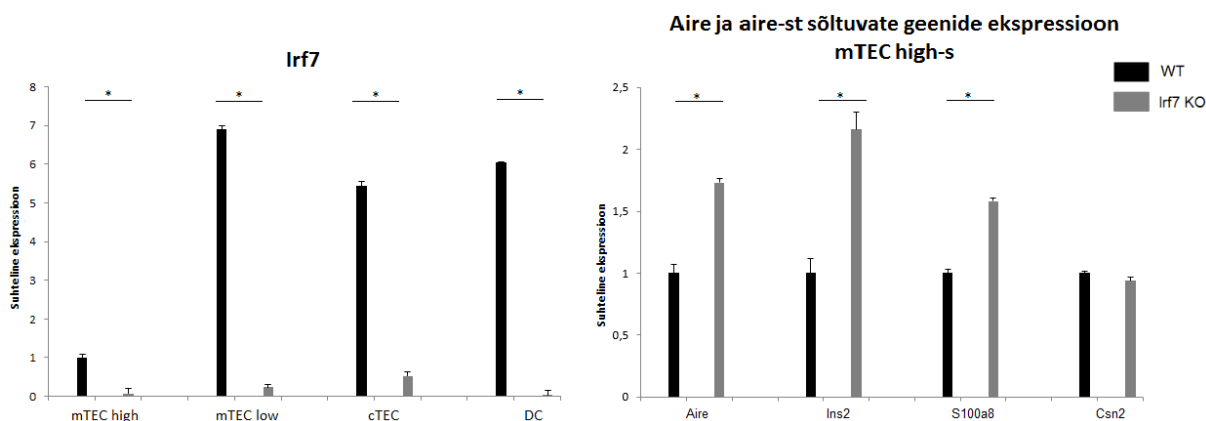
KO hiirt. Statistilise olulisuse ($p < 0,5$) määramiseks kasutati t-testi mitte-paarikaupa andmetele.

Lisaks tümotsüütide põhipopulatsioonidele analüüsiti veel mitmeid erinevaid tümotsüütide alampopulatsioone: $CD4^+$ ja $CD8^+$ $Qa2^+$ T-rakud, DN1–4, $CCR7^+$ ja $CCR6^+$ T_{reg} , $\gamma\delta$ T-rakud ja $CD4^+$ T_{reg} , kuid ka nende puhul ei leitud erinevusi (LISA 1).

2.3.5 *Irf7* mõjutab TEC-ide ja dendriitrakkude geeniekspressiooni

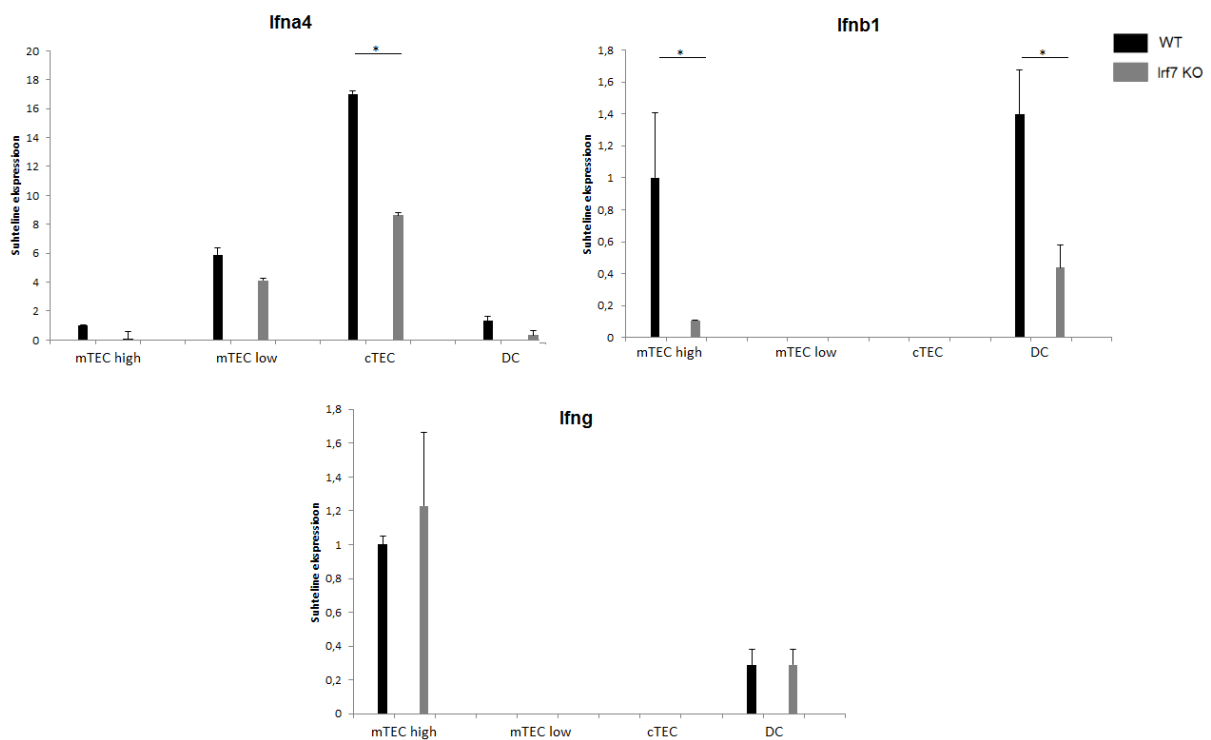
Uurimistöös uuriti mitmete geenide ekspressiooni sorditud *Irf7* KO ja WT hiirte stroomarakkude ja dendriitrakkudes, mis sortiti vastavalt $mTEC^{high}$, $mTEC^{low}$, cTEC ja DC ning $Sirp\alpha^+$, $Sirp\alpha^-$ dendriitrakkude ja pDC fraktsiooniks.

Sorditud TEC rakkudel määrati esmalt *Irf7* ekspression ning veenduda, et uuritavates *Irf7* KO proovides tõepoolest puudub *Irf7*-geen. Ootuspäraselt oli *Irf7* KO rakkudes selle geeniekspressioon madal. Et teada saada, kas *Irf7* mõjutab $mTEC^{high}$ -populatsioonis tümotsüütide negatiivseks selektsiooniks vajalike geenideekspressiooni, vaadati *Aire* ja temast sõltuvate geenide ekspressiooni. *Aire* geeni, mis kodeerib $mTEC^{high}$ koespetsiifiliste valkude ekspressiooni eest vastutavat transkriptsioonifaktorit Aire-t, ekspressioon oli *Irf7* KO $mTEC^{high}$ suurenenud kolmveerandi võrra ning samuti oli tõusnud *Aire*-st sõltuvate geenide *S100a8* ja *Ins2* ekspressioon – vastavalt poole ja kolmveerandi võrra. *Csn2* geeniekspressioonis muutust ei tuvastatud (joonis 5).



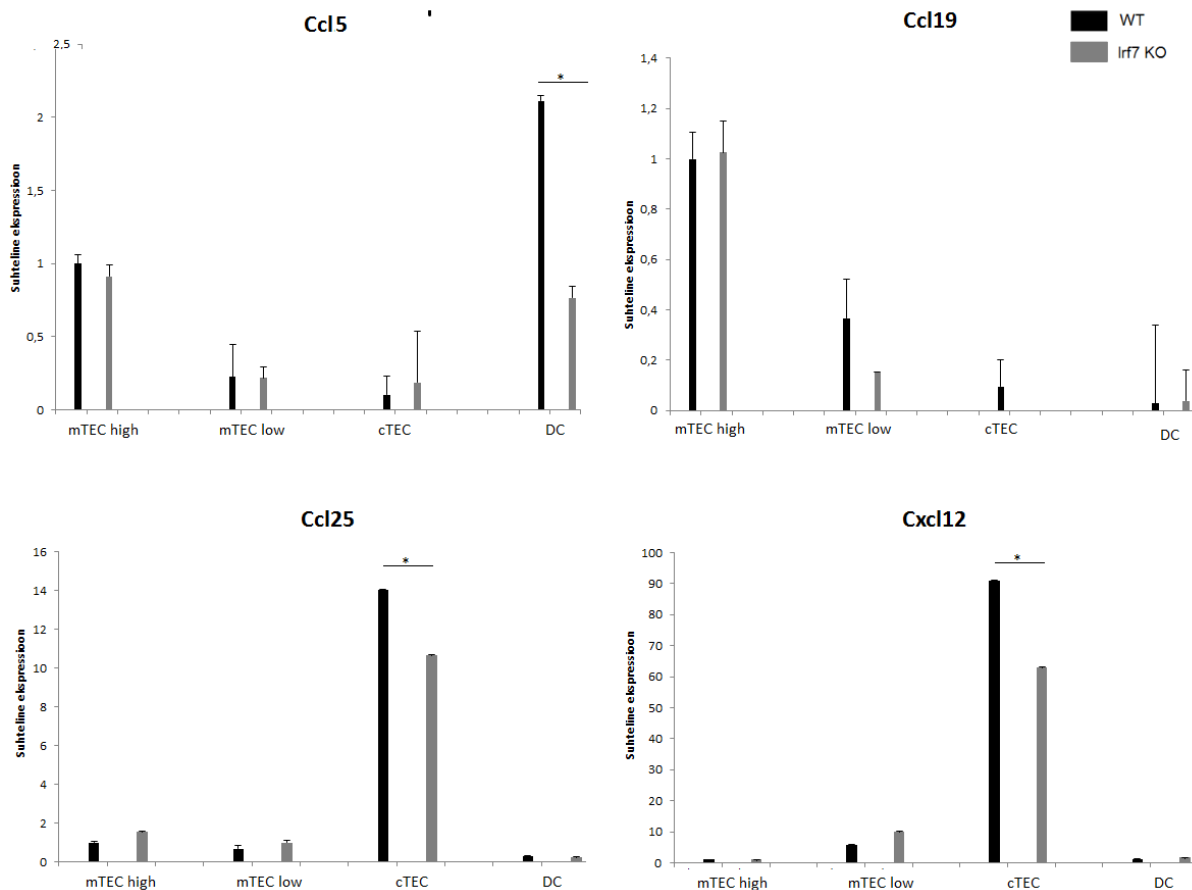
Joonis 5: WT ja Irf7 KO mTEC^{high}, mTEC^{low}, cTEC ja DC fraktsiooniks sortitud rakkude *Irf7* ja *Aire*, *Ins2*, *S100a8* ning *Csn2* geeniekspressiooni RT-qPCR tulemused. *Aire*, *Ins2*, *S100a8* ja *Csn2* ekspressiooni on näidatud ainult mTEC^{high} rakkudes. Katses kasutati 4 WT ja 4 Irf7 KO hiirt. Tulpdiagrammidel on statistiliselt oluline leid tähistatud tärniga.

TEC-ide interferoonide analüüsimisel selgus, et Irf7 poolt reguleeritud 1. tüüpi interferoonide ekspressioon oli Irf7 KO-s langenud: *Ifna4*, mis kodeerib interferoon α valku, ekspressioon oli langenud cTEC-ides poole võrra ja *Ifnb1*, mis kodeerib interferoon β valku, ekspressioon oli langenud mTEC^{high} kolm korda ning dendriitrakkudes kaks kolmandikku. Interferoon γ , mis on 2. tüüpi interferoon, kodeerivas *Ifng* geeniekspressioonis erinevusi ei tähendatud. Samuti selgus, et dendriitrakud ekspresseerivad *Ifnb1* sama kõrgelt kui mTEC^{high} (joonis 6).



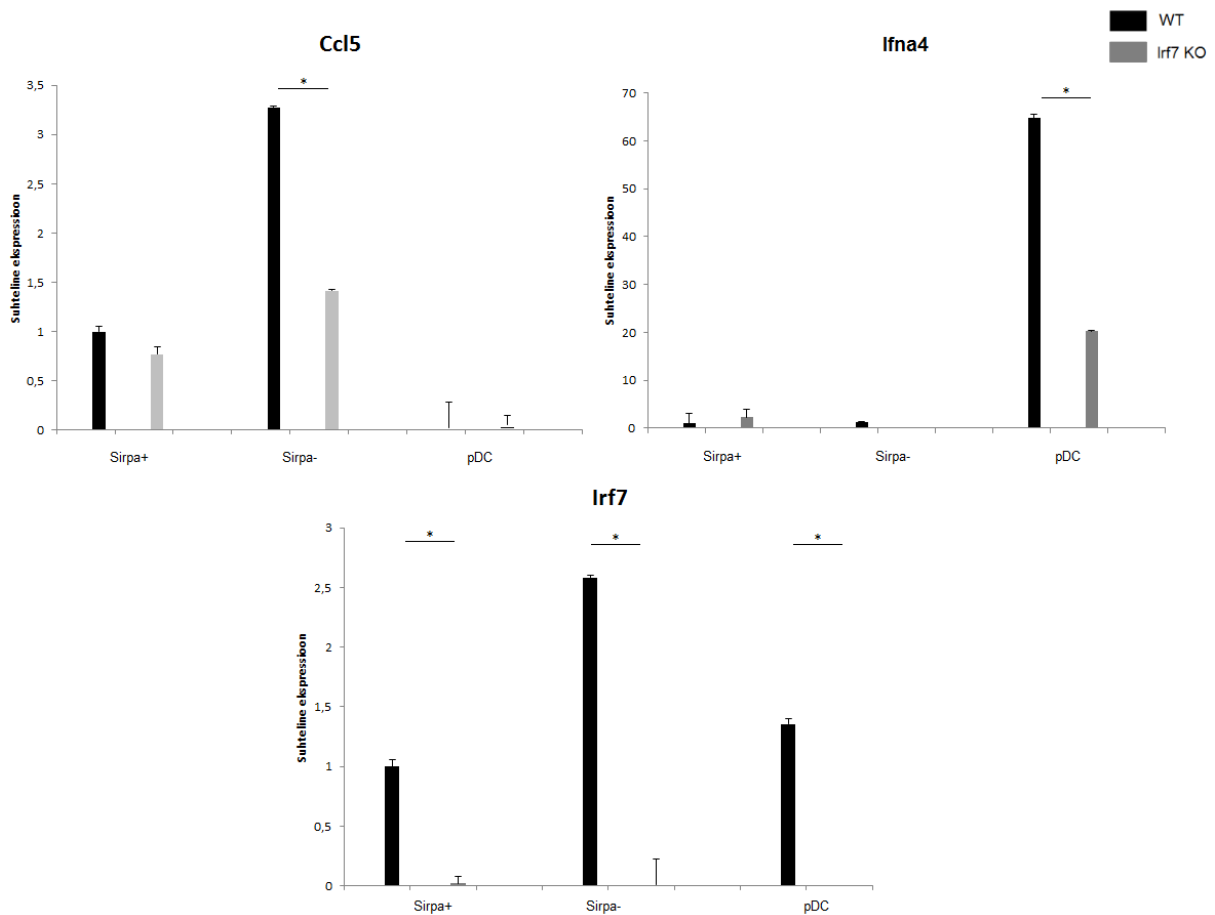
Joonis 6: WT ja Irf7 KO mTEC^{high}, mTEC^{low}, cTEC ja DC fraktsiooniks sortitud rakkude *Ifna4*, *Ifnb1* ja *Ifng* geeniekspressiooni RT-qPCR tulemused. Katses kasutati 4 WT ja 4 Irf7 KO hiirt. Tulpdiagrammidel on statistiliselt oluline leid tähistatud tärniga.

Sorditud TEC-idel tümotsüütide liikumist ja diferentseerumist määravate kemokiinide ekspressiooni analüüsimisel leiti, et *Irf7* KO cTEC-ides oli *Cxcl12* ja *Ccl25* kemokiinide ekspressioon langenud umbes veerandi võrra, dendriitrakkudel oli *Ccl5* ekspressioon langenud kaks kolmandikku ning *Ccl19* ekspressioonis muutusi ei leitud (joonis 7).



Joonis 7: WT ja *Irf7* KO mTEC^{high}, mTEC^{low}, cTEC ja DC fraktsiooniks sorditud rakkude *Ccl5*, *Ccl19*, *Ccl25* ja *Cxcl12* geeniekspressiooni RT-qPCR tulemused. Katses kasutati 4 WT ja 4 *Irf7* KO hiirt. Tulpdiagrammidel on statistiliselt oluline leid tähistatud tärniga.

Sorditud dendriitrakkudes analüüsiti *Ccl5*, *Ifna4* ja positiivseks kontrolliks *Irf7* ekspressiooni. Sorditud dendriitrakkudes praktiliselt puudus *Irf7*, mis kinnitas, et uuritavaks grupiks olid tõepoolest *Irf7*-puudulikud hiired. Selgus, et *Irf7* KO Sirpα⁺ rakkudes oli langenud *Ccl5* ja *Ifna4* ekspressioon pea kahe kolmandiku võrra (joonis 8).



Joonis 8: Irf7 KO ja WT Sirpa⁺, Sirpa⁻ ja pDC fraktsiooniks sortitud dendriitrakkude *Ccl5*, *Ifna4* ja *Irf7* geeniekspressiooni RT-qPCR tulemused. Katses kasutati 4 WT ja 4 Irf7 KO hiirt. Tulpdiagrammidel on statistiliselt oluline leid tähistatud tärniga.

2.4 Arutelu

TEC-ide diferentseerumist uurides leiti voolutsütomeetrilises analüüsis, et Irf7 KO-des oli cTEC-ide osakaal kõrgem kui WT-s. Samas UEA-1-ga markeeritud küpsete mTEC-ide populatsioonis ning mTEC^{high} ja mTEC^{low} alampopulatsioonides erinevusi ei leitud. Samuti ei nähtud immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüsis erinevusi küpsete UEA-1⁺ mTEC rakkude paiknemises, UEA-1 signaali tugevusel ega ka muutusi tuumuse säsisaarte suurustel, arvukusel jt morfoloogilistel omadustel. Antud tulemustest järeldub, et Irf7 võib mängida rolli cTEC-ide arengus, kuid mitte mTEC-ide arengus. Saadud tulemus on aga vastuolus Otero jt tööga (Otero *et al.*, 2013), kus näidati, et Irf7 KO hiirtes on väiksemad säsisaared ning vähem säsis paiknevaid Aire⁺ UEA-1⁺ mTEC-e, mis viitab mTEC-ide võimalikule küpsemishäirele, samas cTEC-ides häired nende töös ei tuvastatud. Kuna TEC-ide

voolutsütomeetria analüüs teostati üks kord, siis tuleks cTEC-ide võimaliku küpsemishäire olemasolu ja mTEC-idel küpsemishäire puudumist kinnitada volutsütomeetria kordusanalüüsiga.

TEC-ide geeniekspressiooni uurimisel selgus, et *Irf7* mõjutab tümotsüütide diferentseerumisega ja migratsiooniga seotud kemokiinide ja *Aire* ekspressiooni ning ootustekohaselt 1. tüüpi interferoonide ekspressiooni, mille funktsioonist tühimuses on väga vähe teada. Kemokiinide uurimisel leiti, et cTEC-ides oli *Cxcl12* ja *Ccl25* ekspressioon vähenenud umbes veerandi võrra. *Aire* ekspressiooni uurimisel selgus, et *Aire* ja *Aire*-st sõltuvate geenide (*S100a8* ja *Ins2*) ekspressioon oli *Irf7* KO mTEC^{high} tõusnud rohkem kui poole võrra. Meie katsete põhjal võiks vastupidiselt varem publitseeritud teadustööle (Otero et al, 2013) väita, et *Irf7* KO hiirte mTEC^{high}-populatsioonis on *Aire*-ekspressioon tõusnud, siis on *Irf7* puhul tegemist *Aire*-geeni otsese või kaudse negatiivse regulaatoriga. Interferoonide ekspressiooni uurimisel selgus, et *Ifna* kodeeriva *Ifna4* geeniekspressioon oli *Irf7* KO cTEC-ides langenud poole võrra ja *Ifn* kodeeriva *Ifnb1* geeniekspressioon *Irf7* KO mTEC^{high} langenud kolm korda. *Ifng* ekspressioonis erinevust ei tuvastatud, mis oli ka ootuspärane tulemus, kuna *Ifn* on 2. tüüpi interferoon ja see ei ole *Irf7* poolt reguleeritud. Siiski ei saa märkimata jätta, et *Ifng* ekspressiooni analüüsis oli *Irf7* KO mTEC^{high} väga kõrge standardveaga, mistõttu ei saa täie kindlusega väita, kas *Irf7* KO ja WT mTEC^{high} rakkudes esines erinevust *Ifng* ekspressioonis või mitte, seega oleks vaja sooritada korduskatse.

Dendriitrakkude uurimisel selgus, et *Irf7* KO ja WT *Sirp*⁺, *Sirp*⁻ ja pDC alampopulatsioonide jaotuses erinevus puudub. Samuti ei nähtud tühimuses erinevusi immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüsis CD11c⁺ dendriitrakkude paiknemisel. Küll aga leiti muutusi dendriitrakkude geeniekspressioonis. Selgus, et kemokiini *Ccl5* ekspressioon oli *Irf7* KO sorditud dendriitrakkude *Sirp*⁺ fraktsioonis ning sorditud TEC-ide dendriitrakkude fraktsioonis, kus on ainult *Sirp*⁺ ja *Sirp*⁻ dendriitrakud, langenud mõlemal juhul pea kaks kolmandiku. Interferoonide ekspressiooni uurides selgus, et *Irf7* KO-des langes *Ifna4* ekspressioon *Sirp*⁻ rakkudes kolmveerandi võrra ning *Ifnb1* ekspressioon langes sorditud TEC rakkude dendriitrakkude fraktsioonis kaks kolmandikku. Tehnilistel põhjustel ei õnnestunud määrata sorditud dendriitrakkudes täpne *Ifn* tootev dendriitrakutüüp. Antud tulemustest võib järeldada, et *Irf7* ei osale dendriitrakkude tühimuse koloniseerimisel ega diferentseerumisel, küll aga mõjutab dendriitrakkude geeniekspressiooni. Samas, ei saa välistada võimalust, et mõned muud mehhanismid kompenseerivad *Irf7* ja *Ifn* puudujääki

ning seetõttu saadigi voolutsütomeetria ja immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüsis positiivseid tulemusi.

Kui varasemalt on peetud tüümuses kõige olulistemaks *Ifn β* tootvateks rakkudeks TEC-e, siis antud uurimistöös selgus, et *Sirp α^+* ja *Sirp α^-* rakke sisaldav dendriitrakkude fraktsioon ekspresseerib *Ifn β* sama kõrgelt kui TEC-id. Seetõttu saab tüümuse dendriitrakke pidada samuti olulisteks *Ifn β* tootvateks rakkudeks.

Huvitaval kombel ei leitud häiritud talitusega tüümuse voolutsütomeetrilises analüüsis erinevusi tümotsüütide erinevate alampopulatsioonide vahel. Põhjus, miks *Irf7* puudulikes hiirtes ei teki tümotsüütides diferentseerumishäireid, võib tuua välja kaks: muutunud rakupopulatsioonide ja nende poolt ekspresseeritud valkude tootmise vahel toimub negatiivne tagasiside või muutunud geeniekspressioonist tingitud valgu defitsiiti või ülejääki kompenseeritakse teiste geenide poolt. Negatiivse mehhanismiga saab selgitada näiteks osa kemokiinide ja *Aire* ekspressiooni: kuna *Irf7* KO-des on cTEC rakke rohkem, siis negatiivse tagasiside mehhanismiga toodetakse neis rakkudes vastavalt *Cxcl12* ja *Ccl25* kemokiine vähem. *Aire* puhul oleks selgitus järgmine: on näidatud, et *Irf7* KO-des on küpseid *Aire⁺ UEA-1⁺* rakke vähem. Seetõttu on ka *Aire*-t tootvaid rakke on vähem ning järelikult toodetaksegi raku kohta *Aire*-t rohkem, et ei tekiks *Aire* defitsiiti. Siiski antud uurimistöös ei tuvastatud muutusi *UEA-1⁺* rakkude jaotuses, mis on ka küpsete, *Aire*-t ekspresseerivate rakkude markeriks, ning seega toimub tõenäoliselt *Aire* üle ekspresseerimine. Kuna negatiivse tagasisidemehhanismiga saab selgitada üksikute geenide toimimist, siis tõenäoliselt toimub tüümuses enamik juhtudel muutunud geeniekspressiooni kompenseerimine teiste geenide poolt. Kuna *Ifn α* ja *Ifn β* tootmine on märkimisväärselt langenud, kuid tümotsüütide arenguhäireid ei leitud, siis võib järeldada, et *Irf7* ja *Ifn β* ei mängi rolli tümotsüütide arengus, samas ei saa välistada, et ka siin toimub puudujäägi kompenseerimine.

Käesoleva bakalaureusetöö olulistemaks leidudeks võib pidada *Irf7* ning *Ifn β* võimalikku rolli cTEC-ide küpsemises ning nende valkude võimalikku rolli puudumist mTEC, dendriitrakkude ja tümotsüütide arengus. Samuti tehti kindlaks, et dendriitrakud on tüümuses olulised *Ifn β* tootvad rakud ning nähti, et *Irf7* puudulikkus mõjutab mitmete geenide ekspressiooni. Küll aga jäi selgusetuks TEC-ide ja dendriitrakkude poolt toodetud *Ifn β* roll tüümuses.

KOKKUVÕTE

Uurimistöö eesmärgiks oli määrata transkriptsioonifaktori *Irf7* ja tema sihtmärkgeeni *Ifnβ* roll tüümuse epiteelirakkudes ja dendriitrakkudes, mis vastutavad tümotsüütide arengu eest. Uurimistöö eesmärgi saavutamiseks uuriti *Irf7* KO ja WT hiirte tüümuseid. Voolutsütomeetrilises analüüsis leiti, et *Irf7* KO-s oli cTEC-e rohkem kui WT-s, kuid samas mTEC-de, dendriitrakkude ning tümotsüütide alampopulatsioonides erinevusi ei leitud. Samuti ei leitud erinevusi immuunfluorestsentsmikroskoopia analüüsis CD11c⁺ dendriitrakkude ja küpsete UEA-1⁺ mTEC rakkude paiknemisel. Küll aga leiti muutusi TEC-ide ja dendriitrakkude geeniekspressioonis. Nähti, et *Irf7* KO-des oli *Aire* ja *Aire*-st sõltuvate geenide ekspressioon tõusnud ning vähenenud olid mitmete kemokiinide ja 1. tüüpi interferoonide ekspressiooni. Veel selgus, et dendriitrakud olid TEC-ide kõrval ühed olulised *Ifnβ* tootvad rakud. Antud tulemuste põhjal järeldati:

- *Irf7* võib mängida rolli cTEC-ide diferentseerumiseks, kuid mitte mTEC-ide diferentseerumiseks.
- *Irf7* ei mängi rolli tüümuse dendriitrakkude ja tümotsüütide diferentseerumisel.
- *Irf7* mõjutab tüümuses 1. tüüpi interferoonide, kemokiinide ja *Aire* ekspressiooni.
- Tüümuse dendriitrakkudes on kõrge *Ifnβ* ekspressioon.

Antud katsete põhjal ei selgunud siiski dendriitrakkude ja TEC-ide poolt toodetud *Ifnβ* funktsioon tüümuses, mistõttu nende funktsiooni väljaselgitamiseks on vajalikud edasised uuringud.

Irf7 ja Ifn β function in thymocyte development directing thymic epithelial cells and dendritic cells

Artur Stoljar

Summary

The thymus is a primary lymphoid organ, where immature T cells or thymocytes develop into mature T-lymphocytes. T cells are critical to the adaptive immune system, where the body specifically eliminates foreign pathogens and prevents their growth. Thymocyte development is directed by dendritic cells (DCs) and thymic epithelial cells (TECs) (Murphy, 2012).

Interferon regulatory factor 7 (IRF7) and interferon β (IFN β) have been thoroughly studied in the peripheral immune system, where IRF7 regulates IFN β , IFN α and other type I IFN gene transcription in lymphoid tissues in response to viral nucleic acids (Paun and Pitha, 2007). IRF7 also regulates the differentiation, oncogenesis and function of several immune cell populations (Savitsky *et al.*, 2010; Takaoka *et al.*, 2008; Tamura *et al.*, 2008; Tanaka and Taniguchi, 2000 and Gabriele and Ozato, 2010). However, not much is known about IRF7 and IFN β functions in the thymus. IRF7 has been shown to be expressed by TECs and is required for the constitutive IFN β expression by medullary TEC (mTEC), maintenance of thymic architecture and mTEC differentiation. It has been shown that *Irf7*-deficient (*Irf7*^{-/-}) mice have smaller medullas and lowered number of mTECs positive for UEA-1, a mature mTEC marker, and Aire, a transcription factor, which is responsible for tissue specific antigen expression. It has been also shown that *Aire*^{-/-} mice have lowered constitutive *Ifn β* expression (Otero *et al.*, 2013 and Lienenklaus *et al.*, 2009).

To delineate the role of IRF7 ja IFN β in the thymus, we analyzed the thymi of WT and *Irf7*^{-/-} mice. Our flow cytometric (FC) analysis confirmed the previously identified increase in cortical TEC in *Irf7*^{-/-} mouse thymi. However, we found no disturbances in the mature medullary TEC compartment and DCs by FC. Immunofluorescence analysis of UEA-1⁺ and CD11c⁺ cells also didn't show any changes. Nevertheless, RT-qPCR analysis of FACS-sorted thymic stromal cells and DCs revealed decreased expression of *Ccl5*, *Ccl12* and *Cxcl12* – chemokines, which are directing early thymocyte development. We also saw a decrease in *Ifn α* and *Ifn β* expression, but no difference in the expression of type 2. interferon *Ifn γ* and we identified DCs to be another major source of *Ifn β* in the thymus, in addition to TECs. To

our surprise, we found that *Aire* and *Aire*-dependent gene expression was increased. Despite the changes in gene expression, FC analysis of both early and late stage thymocytes did not show any differences between WT and *Irf7*^{-/-} mice. Hence, our analysis suggests that *Irf7* is dispensable for TEC and DC function. The role of the constitutive *Ifn* β expression in the thymic stroma remains elusive and should be further analyzed in follow-up studies.

TÄNUSÕNAD

Kõige enam soovin tänada oma juhendajat Uku Haljasorgu suurepärase juhendamise eest. Veel tahan tänada Rudolf Bichelet, Martti Laant, Maire Pihlapit ja Tõnis Orgu, kes rõõmuga aitasid selle töö valmimisel kaasa. Samuti tänan kõiki teisi laborikaaslasid rõõmsa meele ja heade nõuannete eest ning loomulikult ka professor Pärt Petersoni, kes andis võimaluse teha tööd Molekulaarpatoloogia töögrupis.

KIRJANDUSE LOETELU

Artiklid:

Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C., Mathis, D. (2010). Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell*. 140(1):123-35.

Bosselut, R. (2004). CD4/CD8-lineage differentiation in the thymus: from nuclear effectors to membrane signals. *Nat Rev Immunol*. 4, 529–540.

Bunting, M. D., Comerford, I., Kara, E. E., Korner, H., McColl S. R. (2014). CCR6 supports migration and differentiation of a subset of DN1 early thymocyte progenitors but is not required for thymic nTreg development. *Immunol Cell Biol*. 92(6):489-98.

Chan, C., Anderson, M. C. (2015). Central tolerance to self revealed by the autoimmune regulator. *Ann N Y Acad Sci*. 1356:80-9.

Chen, J., Baig, E., Fish, E. N. (2004). Diversity and relatedness among the type I interferons. *J Interferon Cytokine Res*. 24(12):687-98.

Deonarain, R., Verma, A., Porter, A. C., Gewert, D. R., Plataniias, L. C., Fish, E. N. (2003). Critical roles for IFN- β in lymphoid development, myelopoiesis, and tumor development: links to tumor necrosis factor α . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(23):13453-8.

Derbinski, J., Pinto, S., Rösch, S., Hexel, K., Kyewski, B. (2008). Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(2):657-62.

Gabriele, L., Ozato, K. (2010). The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine Growth Factor Rev*. 18: 503–510.

Gotter, J., Kyewski, B. (2004). Regulating self-tolerance by deregulating gene expression. *Curr Opin Immunol*. 16, 741-745.

Gray, D. H. D., Seach, N., Ueno, T., Milton, M. K., Liston, A., Lew, A. M., Goodnow, C. C., Boyd, R. L. (2006). Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood*. 108(12):3777-85.

Gresser, I., Belardelli, F. (2002). Endogenous type I interferons as a defense against tumors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 13(2):111-8.

Hadeiba, H., Butcher, E. C. (2013). Thymus-homing dendritic cells in central tolerance. *Eur J Immunol*. 43(6):1425-9.

Halkias, J., Melichar, H. J., Taylor, K. T., Ross, J. O., Yen, B., Cooper, S. B., Winoto, A., Robey, E. A. (2013). Opposing chemokine gradients control human thymocyte migration in situ. *J Clin Invest*. 123(5): 2131–2142.

Hasegawa, H., Matsumoto, T. (2018). Mechanisms of tolerance induction by dendritic cells in vivo. *Front Immunol*. 9: 350.

- Ikushima, H., Negishi, H., Taniguchi, T. (2013). The IRF family transcription factors at the interface of innate and adaptive immune responses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 78:105-16.
- Kawai, T., Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13: 816–825.
- Klein, L., Hinterberger, M., von Rohrscheidt, J., Aichinger, M. (2011). Autonomous versus dendritic cell-dependent contributions of medullary thymic epithelial cells to central tolerance. *Trends Immunol.* 32(5):188-93.
- Kwan, J., Killeen, N. (2004). CCR7 directs the migration of thymocytes into the thymic medulla. *J Immunol.* 172(7):3999-4007.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., Tough, D. F. (2001). Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity.* 14:461-470.
- Lienenklaus, S., Cornitescu, M., Zietara, N., ... Weiss, S. (2009). Novel reporter mouse reveals constitutive and inflammatory expression of IFN- β in vivo. *J Immunol.* 183(5):3229-36.
- Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L., Goodnow, C. C. (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol.* 4(4):350-4.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see and don't see. *Nat Rev Immunol.* 14(6):377-91.
- McInerney, G. M., Hidmark, Å. S., Nordström, E. K. L., Douagi, I., Kristen, M., Werner, K. M., Liljeström, P., Karlsson, H. G. B. (2005). Early α/β interferon production by myeloid dendritic cells in response to UV-inactivated virus requires viral entry and interferon regulatory factor 3 but not MyD88. *J Virol.* 79(16):10376-85.
- Montoya, M., Schiavoni, G., Mattei, F., Gresser, I., Belardelli, F., Borrow, P., Tough, D. F. (2002). Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood.* 99:3263-3271.
- Nguyen, H., Hiscott, J., Pitha, P. M. (1997). The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8(4):293-312.
- Ning, S., Pagano, J. S., Barber, G. N. (2011). IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes Immun.* 12(6):399-414.
- Otero, D. C., Baker, D. P., David, M. (2013). IRF7-dependent IFN β production in response to RANKL promotes medullary thymic epithelial cell development. *J Immunol.* 190(7): 3289–3298.
- Pan, J., Zhang, M., Wang, J., Wang, Q., Xia, D., Sun, W., Zhang, L., Yu, H., Liu, Y., Cao, X. (2004). Interferon-gamma is an autocrine mediator for dendritic cell maturation. *Immunol Lett.* 94(1-2):141-51.
- Paun, A., Pitha, P. M. (2007). The IRF family, revisited. *Biochimie.* 89(6-7): 744–753.

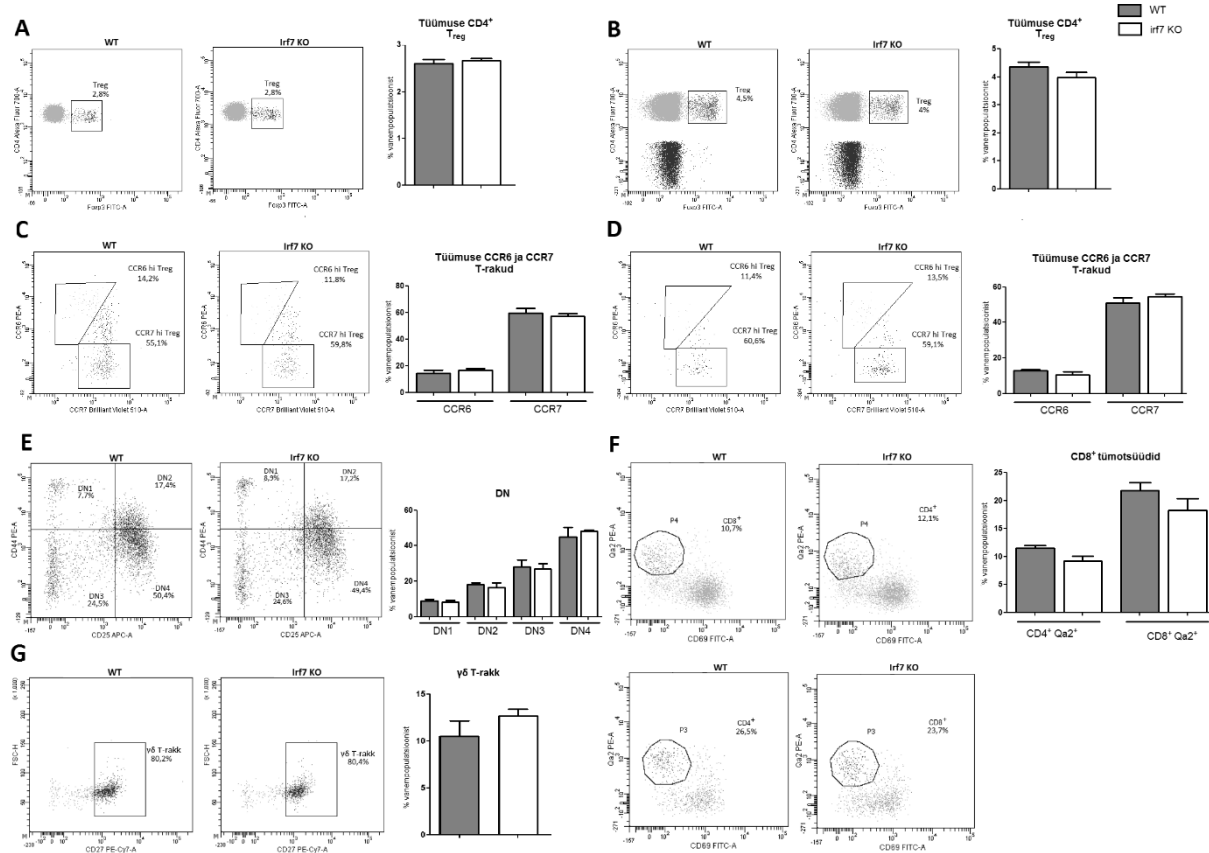
- Porritt, H. E., Gordon, K., Petrie, H. T. (2003). Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice. *J Exp Med.* 198(6):957–62.
- Savitsky, D., Tamura, T., Yanai, H., Taniguchi, T. (2010). Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunol Immunother.* 59: 489–510.
- Schraml, B. U., Reis e Sousa, C. (2015). Defining dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 32:13-20.
- Zaballos, A., Gutiérrez, J., Varona, R., Ardavin, C., Márquez, G. (1999). Identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *J. Immunol.* 162:5671-5675.
- Takaoka, A., Tamura, T., Taniguchi, T. (2008). Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci.* 99: 467–478.
- Takayanagi, H., Kim, S., Matsuo, K., ... Taniguchi, T. (2002). RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of *Il1 β* . *Nature.* 416(6882):744-9.
- Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., Taniguchi, T. (2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annu Rev Immunol.* 26: 535–584.
- Tanaka, N., Taniguchi, T. (2000). The interferon regulatory factors and oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 10: 73–81.
- Ueno, T., Hara, K., Willis, M. S., ... Takahama, Y. (2002). Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus. *Immunity.* 16(2):205-18.
- Vernachio, J., Li, M., Donnenberg, A. D., Soloski, M. J. (1989). Qa-2 expression in the adult murine thymus. A unique marker for a mature thymic subset. *J Immunol.* 142(1):48-56.
- Vicari, A. P., Figueroa, D. J., Hedrick, J. A., ... Zlotnik, A. (1997). A novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity.* 7:291-301.
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol.* 164(6):2978–86.
- Wu, L., Shortman, K. (2005). Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol.* 17(4):304-12.
- Yano, M., Kuroda, N., Han, H., ... Matsumoto, M. (2008). Aire controls the differentiation program of thymic epithelial cells in the medulla for the establishment of self-tolerance. *J Exp Med.* 205(12): 2827–2838.

Raamatud:

Murphy, K. 2012. *Janeway's immunobiology*. 8th ed., Garland Science, Taylor & Francis Group, London, New York.

LISAD

LISA 1. Tümotüütide voolutsütomeetria tulemused



Joonis 9: WT ja Irf7 KO hiirte tüümuste erinevate tümotüütide alampopulatsioonide voolutsütomeetriline analüüs: paneelil A ja B on kahes sõltumatus eksperimendis saadud CD4⁺ T_{reg} analüüs; paneelil C ja D on kahes sõltumatus eksperimendis saadud Ccr7⁺ ja Ccr6⁺ T_{reg} analüüs; paneelil E on DN alampopulatsioonide DN1, DN2, DN3 ja DN4 analüüs; paneelil F on CD4⁺ ja CD8⁺ Qa2⁺ rakkude analüüs ja paneelil G on γδ T-rakkude analüüs. Paneelidel on vasakul poolel uuritavate rakupopulatsioonide *dot plot* graafikud ning paremal poolel uuritavade rakupopulatsioonide analüüsimisel saadud tulpdiagrammid. Igas katses kasutati 4 WT ja 4 Irf7 KO hiirt. Statistilise olulisuse määramiseks ($p < 0,5$) kasutati t-testi mitte-paarikaupa andmetele.

LIHTLITSENTS

Mina, Artur Stoljar

(sünd. 30.03.1995)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Irf7 ja Ifn β funktsioon tüümuse tümotsüütide arengu eest vastutavates tüümuse epiteelirakkudes ja dendriitrakkudes

Irf7 ja Ifn β function in thymocyte development directing thymic epithelial cells and dendritic cells

mille juhendajad on Uku Haljasorg ja Tõnis Org

1.1 reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2018